



**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0076629 호
Application Number 10-2003-0076629

출 원 년 월 일 : 2003년 10월 31일
Date of Application OCT 31, 2003

출 원 인 : 김태윤 외 1명
Applicant(s) KIM TAE YOON, et al.

2004 년 11 월 15 일

특 허 청

COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

1. 류명] 특허출원서
 2. 리구분] 특허
 3. 신치] 특허청장
 4. 출원자] 2003.10.31
 5. 명의 명칭] E C S O D 및 세포 침투성 E C S O D 용합 단백질과 이를 유효성분으로 하는 조성물
 6. 명의 영문명칭] EC SOD and Cell transducing EC SOD fusion protein and composition containing the protein as an effective component
 7. 원인]
 8. 성명] 김태운
 9. 출원인코드] 4-2000-001156-2
 10. 원인]
 11. 명칭] 주식회사 바이오씨에스
 12. 출원인코드] 1-2000-017564-9
 13. 리인]
 14. 성명] 김석현
 15. 대리인코드] 9-1998-000634-1
 16. 포괄위임등록번호] 2002-072543-2
 17. 포괄위임등록번호] 2003-060495-2
 18. 명자]
 19. 성명] 김태운
 20. 출원인코드] 4-2000-001156-2
 21. 명자]
 22. 성명의 국문표기] 정보연
 23. 성명의 영문표기] CHOUNG,Bo-Yeun
 24. 주민등록번호] 750731-2031626
 25. 우편번호] 132-893
 26. 주소] 서울시 도봉구 상문2동 658-4
 27. 국적] KR
 28. 사참구] 청구
 29. 착산염기 및 아미노산 서열 목록]
 30. 서열개수] 19

【서열목록의 전자파일】 첨부
【비지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규
정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
김석현 (인)
수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 51 면 51,000 원
【우선권 주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 25 항 909,000 원
【합계】 989,000 원
【감면사유】 소기업 (70%감면)
【감면후 수수료】 296,700 원
첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1종 2. 소기업임을 증명하는
서류[사업자등록증, 원천징수이행상황신고서] _1종

【요약서】

요약]

본 발명은 EC SOD 및 세포침투성 EC SOD 융합 단백질과 이를 유효성분으로 하는 조
물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 EC SOD(extracellular superoxide
smutase) 및 세포 침투능이 개선된 EC SOD 융합 단백질과 이를 유효성분으로 하는
성산소종 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 EC SDO는 피부 세포 내 활성 산소종을 감소시키는 효과가 우수하며
히, 세포침투성 EC SOD 융합 단백질은 세포침투성이 우수하며, 세포 내 활성 산소
을 감소시키는 효과가 우수하여 활성 산소종과 관련된 질환의 예방 및 치료에 유용
게 사용될 수 있다.

표도]

도 11

표언어]

: SOD, 활성 산소종, 세포침투성, 융합 단백질

【명세서】

발명의 명칭】

EC SOD 및 세포 침투성 EC SOD 융합 단백질과 이를 유효성분으로 하는
성물{EC SOD and Cell transducing EC SOD fusion protein and composition
teining the protein as an effective component}

꺤면의 간단한 설명】

꺤 1은 면역조직염색법을 이용하여 마우스 피부 조직에서의 EC SOD의 분포 양상을
사한 결과를 나타낸 사진이다 (A: 토끼 항 마우스 EC SOD 항체로 면역염색한 결과를
타낸 사진이다. B: 음성대조군으로서 면역화하지 않은 (pre-immune) 토끼 혈청으로
염색한 결과를 나타낸 사진이다).

꺤 2는 마우스 피부의 표피층 및 진피층에서 EC SOD의 발현 양상을 노던 블랏으로
석한 결과를 나타낸 것이다. GAPDH는 로딩 대조군으로 사용하였다 (**: $p<0.05$ 에서
의적 차이 있음).

꺤 3은 마우스에 UVA를 조사한 다음 시간의 경과에 따른 EC SOD의 발현 양상을 노던
럿으로 분석한 결과이다. GAPDH는 로딩 대조군으로 사용하였다 (A: UVA $5\text{kJ}/\text{m}^2$ 조
사, B: $25\text{kJ}/\text{m}^2$ 조사).

꺤 4는 마우스에 UVB를 조사한 다음 시간의 경과에 따른 EC SOD의 발현 정도를 노
블랏으로 분석한 결과이다. GAPDH는 로딩 대조군으로 사용하였다 (A:
 J/m^2 조사, B: $8\text{kJ}/\text{m}^2$ 조사, C: $15\text{kJ}/\text{m}^2$ 조사).

Fig. 5는 마우스에 8-MOP를 바르고 1시간 뒤에 UVA를 조사한 다음 시간의 경과에 따른

EC SOD의 발현 정도를 노던 블롯으로 분석한 결과이다. GAPDH는 로딩 대조군으로
용하였다 (A: 5kJ/m² 조사, B: 25kJ/m² 조사).

Fig. 6은 Tet off-MEF/3T3 유도성 유전자 발현 시스템에서 테트라사이클린을 제거하여
(TET OFF) EC SOD의 과발현을 유도하고 시간의 경과에 따른 EC SOD의 발현 양상을 노
던 블롯으로 분석한 결과 (A) 및 EC SOD의 활성 (B)을 나타낸 것이다 (TET ON: 테트라사
이클린 존재하는 경우, TET OFF: 테트라사이클린이 제거된 경우).

Fig. 7a는 본 발명에 따른 마우스 EC SOD 과발현 세포주에 10J/cm²의 UVA를 조사한 후
시간의 경과에 따른 세포 내 활성 산소의 양을 측정하여 대조군의 값에 대한 상대적
값으로 나타낸 그래프이다 (TET ON: 테트라사이클린이 존재하는 경우, TET OFF: 테
트라사이클린이 제거된 경우).

Fig. 7b는 본 발명에 따른 마우스 EC SOD 과발현 세포주에 20mJ/cm²의 UVB를 조사한
시간의 경과에 따른 세포 내 활성 산소의 양을 측정하여 대조군의 값에 대한 상대
적인 값으로 나타낸 그래프이다 (TET ON: 테트라사이클린이 존재하는 경우, TET OFF:
트라사이클린이 제거된 경우).

Fig. 7c는 본 발명에 따른 마우스 EC SOD 과발현 세포주에 0.1% 8-MOP를 처리하고 30
뒤에 2J/cm² UVA 조사한 후 시간의 경과에 따른 세포 내 활성 산소의 양을 측정
여 대조군의 값에 대한 상대적인 값으로 나타낸 결과이다 (TET ON: 테트라사이클린
존재하는 경우, TET OFF: 테트라사이클린이 제거된 경우).

Fig. 8은 본 발명에 따른 사람 EC SOD 과발현 백터의 개열 지도를 나타낸 것이다.

- 9는 본 발명에 따른 사람 EC SOD 과발현 벡터로 형질전환된 사람-라티노사이트(human keratinocyte) 세포주에서 발현된 EC SOD를 웨스턴 블롯으로 인한 결과이다.
- 10은 사람 EC SOD 과발현 세포주에 자외선을 조사하고 이에 따른 사멸한 세포의 유효를 유세포 분석기로 측정한 결과이다.
- 11은 본 발명에 따른 세포침투성 EC SOD 융합단백질을 발현하는 벡터의 개열 지를 나타낸 것이다.
- 12는 정제된 TAT-EC SOD 융합 단백질 및 TAT-ΔHD/EC SOD 융합 단백질을 전기영으로 확인한 사진이다.
- 13은 정제된 TAT-EC SOD 융합 단백질, K10-EC SOD 융합 단백질 및 R9-EC SOD 융합 단백질을 전기영동으로 확인한 사진이다.
- 14는 본 발명의 TAT-EC SOD 융합 단백질 및 TAT-ΔHD/EC SOD 융합 단백질이 케티노사이트 세포 내로 침투하여 핵 내에 위치해 있는 것을 면역 조직 화학법에 의한 관찰한 사진이다(빨간색: 세포 핵, 연두색: 융합 단백질).
- 15는 본 발명의 TAT-EC SOD 융합 단백질 및 TAT-ΔHD/EC SOD 융합 단백질의 세포 침투 효율을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다.

발명의 상세한 설명]

발명의 목적]

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술]

본 발명은 EC SOD 및 세포침투성 EC SOD 용합 단백질과 이를 유효성분으로 하는 조
물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 EC SOD(extracellular superoxide
smutase) 및 세포 침투능이 개선된 EC SOD 용합 단백질과 이를 유효성분으로 하는
성산소종 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산소를 이용하여 에너지를 얻는 모든
명체에서, 여러 세포 내 대사 과정의 부산물로 필연적으로 생성된다. 그러나, 활
산소종에 과다하게 노출되는 경우, 세포 내의 단백질, 핵산 및 지방과 같은 생체고
자가 손상을 입게 된다. 이로 인해 암, 뇌졸중, 관절염, 동맥경화 및 여러 염증
증이 유발될 수 있으며, 노화가 촉진될 수 있다(Floyd, R. A., *FASEB J.*, 4,
87-2597, 1990; Anderson, W. F., *Nature*, 392, 25-30, 1998; Halliwell B. et
., *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, Oxford).
현대에 들어서면서, 심각한 대기오염과 오존층의 감소로 인한 자외선 노출과 같은
부적인 요소가 활성산소종의 주요한 발생원인이 되고 있다. 이와 같은 요인으로
영 발생된 활성산소종은 피부에 손상을 가져와 피부노화와 피부암과 같은 피부 질
을 유발시킬 수 있다.

세포 내에는 활성산소종에 대한 방어기능으로서 SOD(superoxide dismutase), 카탈라제(catalase), 퍼옥시다제(Peroxidase)와 같은 항산화 효소를 가지고 있다. 이 중 SOD는 대표적인 항산화 효소로 활성산소를 제거하고 세포를 보호하는 기능을 가지고 있다. 특히, SOD는 활성산소를 과산화수소로 전환하여 다른 항산화 효소가 작용할 수 있도록 하는 기능을 한다. SOD는 구리와 아연 원자를 가지고 있는 Cu/Zn SOD, 망간 원자를 가지고 있는 Mn SOD 및 세포 표면 또는 세포 외액에 존재하는 EC SOD(extracellular superoxide dismutase)로 구분된다.

Cu/Zn SOD와 같이 구리 및 아연 원자를 가지고 있으나, C-말단 쪽에 헤파린 결합 도메인(heparin binding domain)이 존재한다는 특징이 있다. EC SOD는 헤파린 결합 도메인을 가지고 있기 때문에 세포막의 헤파린에 결합되어 세포막을 보호하는 역할을 할 것으로 추정되고 있다. 문헌에 따르면, EC SOD는 혈장과 세포 외기 등에서 생체 방어작용을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다(Marklund et al.,

Biochem. J. 266, 213-219, 1990; Su et al., *Am J Respir Cell Mol Biol.*, Feb (2), 162-70, 1997; Luoma et al., *Thromb. Vasc. Bio.* 18, 157-167, 1998). 다른

문헌에는 EC SOD를 이용한 유전자 치료가 토끼에서 대동맥 협착증(aorta stenosis)을 개선시키고 생쥐에서는 콜라겐 유도된 관절염(collagen-induced arthritis)을 완화시킨다고 보고된 바 있다(Mikko O et al., *Circulation*, 106,

99-2003, 2002; Iyama S et al., *Arthritis & Rheumatism*, 44,9,2160-67, 2001).

근에는 EC SOD가 사람 섬유아세포(human fibroblast)에서 세포노화 현상인 텔로머 축(telomere shortening)을 억제하는 세포 재생 기능이 있음이 보고된 바 있다(erra V et al., *The journal of Biological chemistry*, 278, 9, 6824-30, 2003).

한, EC SOD의 헤파린 결합 도메인이 핵 위치 신호(nuclear localization signal)로 작용하여 흉선(thymus)과 고환 세포(testis cell)에서 핵 안에 위치하여 산화적 스트레스로부터 게놈 DNA를 보호하고 산화 환원 반응에 민감한 전사작용을 조절한다고 고된 바 있다(Ookawara T et al., *BBRC*, 296, 54~61, 2002). 그러나, 지금까지 SOD의 피부에서의 분포 경향은 알려진 바가 없으며, 단지, 피부 섬유아세포에서 러 가지 사이토카인에 의해 그 활성이 조절된다고 보고되어 있다(Marklund, , 267, , Issue of April 5, 6696-6701, 1992).

한편, 최근에는 특정의 단백질이 효과적으로 세포막을 통과하여 세포 내로 들어갈 있다는 사실이 밝혀지면서 이러한 단백질을 운반수단으로 이용하여 세포 내로 유 물질을 전달하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그 대표적인 단백질들로 HIV의 Tat 단백질을 비롯하여 ANTP, VP22 단백질 등이 있다(Lindgren et al., *PS* 21:99, 2001; Green et al., *Cell*, 55, 1179-1188, 1988)). 상기 단백질의 세포 침투능은 세포막 인지질의 이중층을 통과할 수 있는 활성을 가지는 단백질 전달 역(Protein Transduction Domain, PTD)의 특성으로 인해 부여된다고 알려져 있다(Ankel A. D. et al., *Cell*, 55, 1189~1193, 1988; Green M. et al., *Cell*, 55, 79-1188, 1988).

한편, 치료제로 사용되는 약물이나 단백질은 대개의 경우 자발적으로 세포막을 통과 수 없다. 최근에, 상기와 같이 단백질 전달 영역이 규명되면서, 이를 이용하여 용한 단백질을 세포 내로 도입하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

그러나, 아직까지 상기와 같은 단백질 전달 도메인이 외래 단백질을 세포 내로 운반하는 메커니즘에 대해서는 명확히 규명되어 있지 않으며, 실제 모든 종류의 단백질이 단백질 전달 도메인에 의해 운반되는 것은 아니다.

발명자들은 EC SOD의 특성에 대해 연구한 결과, EC SOD가 생체 피부에 전반적으로 넓게 분포되어 있고, 특히 유해 자외선에 의해 그 발현이 조절되며 세포 내에서 SOD가 과발현되는 경우 자외선에 의해 유발된 활성 산소가 감소한다는 새로운 사실을 확인하였다. 이에 본 발명자들은 EC SOD를 활성산소종과 관련된 질환의 예방 또는 치료용 약제로 사용하기 위해 EC SOD의 아미노 말단에 단백질 전달 도메인이 결합된 세포침투성 융합 단백질을 제조한 다음, 상기 융합 단백질이 피부세포 내로 효과적으로 침투됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[발명이 이루고자 하는 기술적 과제]

따라서, 본 발명의 목적은 EC SOD의 아미노 말단에 HIV-1 Tat 형질도입부위(아미노 잔기 49~57), 5~12개의 아르기닌 잔기로 구성된 올리고펩타이드 및 5~12개의 이신 잔기로 구성된 올리고펩타이드 중에서 선택된 어느 하나의 단백질 전달 도메인이 결합된 세포침투성 EC SOD 융합 단백질을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

! 발명의 다른 목적은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는

-현 벡터를 제공하는 것이다.

! 발명의 다른 목적은 상기 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 것이다.

! 발명의 다른 목적은 상기 세포침투성 EC SOD 융합 단백질의 제조방법을 제공하는
이다.

! 발명의 다른 목적은 상기 세포침투성 EC SOD 융합 단백질을 유효성분으로 하는
성 산소종 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

! 발명의 다른 목적은 EC SOD 단백질을 유효성분으로 하는 활성 산소종 관련 피부
환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

! 발명의 다른 목적은 상기 세포침투성 EC SOD 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레
티드를 포함하는 발현 벡터를 유효성분으로 하는 활성 산소종 관련 질환의 예방 또
치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

! 발명의 다른 목적은 상기 EC SOD 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하
발현 벡터를 유효성분으로 하는 활성 산소종 관련 피부 질환의 예방 또는 치료용
학적 조성물을 제공하는 것이다.

! 발명의 다른 목적은 상기 세포침투성 EC SOD 융합 단백질을 포함하는 화장료 조
물을 제공하는 것이다.

! 발명의 다른 목적은 상기 세포침투성 EC SOD 융합 단백질 또는 EC SOD 단백질을
함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 세포침투성 EC SOD 용합 단백질 또는 EC SOD 단백질을
현하는 벡터로 형질전환된 미생물을 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[발명의 구성 및 작용]

본 발명은 EC SOD의 아미노 말단에 HIV-1 Tat 형질도입부위(아미노산 잔기 49~57),
-12개의 아르기닌 잔기로 구성된 올리고펩타이드 및 5~12개의 라이신 잔기로 구성
올리고펩타이드 중에서 선택된 어느 하나의 단백질 전달 도메인이 결합된 세포침
성 EC SOD 용합 단백질을 제공한다.

한, 본 발명은 상기 세포침투성 EC SOD 용합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드
제공한다.

한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터로
질전환된 숙주 세포를 제공한다.

한, 본 발명은 상기 용합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

한, 본 발명은 상기 세포침투성 EC SOD 용합 단백질을 유효성분으로 하는 활성산
종 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

한, 본 발명은 EC SOD 단백질을 유효성분으로 하는 활성산소종 관련 피부질환의
방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다

한, 본 발명은 상기 세포침투성 EC SOD 용합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드
포함하는 발현 벡터를 유효성분으로 하는 활성산소종 관련 질환의 예방 또는 치료
약학적 조성물을 제공한다.

은, 본 발명은 EC SOD 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터

유효성분으로 하는 활성산소종 관련 피부질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

한, 본 발명은 상기 세포침투성 EC SOD 융합 단백질을 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 세포침투성 EC SOD 융합 단백질을 포함하는 활성산소종 관련 환의 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다.

한, 본 발명은 EC SOD 단백질을 포함하는 활성 산소종 관련 피부질환의 개선 또는 방용 식품 조성물을 제공한다.

한, 본 발명은 상기 세포침투성 EC SOD 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 미생물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

한, 본 발명은 상기 EC SOD 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 미생물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

발명의 일 실시예에서는 마우스 피부에서의 EC SOD의 분포 경향을 면역 조직 화학 염색을 통해 조사하였다. 그 결과, EC SOD는 마우스 피부 전반에 걸쳐 분포되어 있음을 확인할 수 있었다(실시예 1-1)참조). 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 피부의 진피층과 상피층에서 EC SOD mRNA의 발현 양상을 조사한 결과, EC SOD가 표에서보다 진피층에서 높게 발현된다는 사실을 확인할 수 있었다(실시예 1-2)

조). 상기 실험 결과로부터, EC SOD가 진피층과 표피층에 존재하면서 피부를 보호하는 작용을 수행할 것으로 추정되었다.

이에 본 발명자들은 EC SOD의 피부 내에서의 역할을 직접적으로 규명하기 위해, 본명의 일 실시예에서 마우스의 피부에 여러 종류의 자외선(UVA, UVB 및 PUVA)을 조사한 후 이에 따른 EC SOD의 발현 경향을 경시적으로 비교하였다. 그 결과, EC SOD 자외선의 조사여부에 따라 피부에서의 발현이 조절된다는 사실을 확인할 수 있었다(실시예 1-3) 내지 1-5) 참조). 상기 실험 결과로부터 본 발명자들은 EC SOD가 피부에 전반적으로 분포되어 있으며, 자외선 조사 세기 및 시간의 경과에 따라 그 발현 조절된다는 새로운 사실을 확인하였다. 따라서, EC SOD가 자외선 조사에 의해 유도되는 활성산소종과 관련이 있을 것으로 추정하였다.

상기와 같은 추정을 확증하기 위해, 본 발명자들은 마우스 EC SOD를 공지된 유전자 발현 시스템을 이용하여 마우스 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblast)에서 발현시켜 마우스 EC SOD 과발현 세포주를 제조하고 상기 세포에 자외선을 조사한 활성산소의 양을 측정함으로써 EC SOD의 과발현이 자외선에 의해 유도된 세포 내 활성산소의 양에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 마우스 EC SOD의 과발현이 세포 내 활성산소를 효과적으로 감소시킴을 확인할 수 있었다(실시예 2 참조).

더욱이, 본 발명자들은 사람 EC SOD를 사람 케라티노사이트 세포주에 과발현시켜 사람 EC SOD를 과발현하는 세포주를 제조하고 상기 세포에 자외선을 조사한 후 세포사를 측정함으로써 사람 EC SOD의 과발현이 자외선에 의해 유도된 세포사멸에 미치는

향을 조사하였다. 그 결과, 사람 EC SOD의 과발현이 자외선에 의한 세포사멸을
-과적으로 감소시킴을 확인할 수 있었다(실사에 3 참조).

따라서, EC SOD는 활성산소종과 관련된 질환의 예방 및 치료에 효과적으로 사용될
있다. 특히, EC SOD는 피부 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 피부 질
으로는 피부암 또는 기미, 주근깨 등과 같은 색소 침착성 질환을 들 수 있다. 또
, 상기 EC SOD는 활성 산소에 의한 주름과 같은 노화 및 유해 자외선과 방사선에
한 광노화를 억제하거나 예방하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 EC SOD를
효성분으로 하는 활성산소 관련 피부 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공
다.

발명자들은 EC SOD를 활성 산소와 관련된 피부 질환의 예방 또는 치료용 조성물
의 적용을 더욱 용이하게 하기 위해 EC SOD에 HIV-1 Tat의 형질도입부위(아미노산 잔
기 49~57), 5~12개의 아르기닌 잔기로 구성된 올리고펩타이드 및 5~12개의 라이
잔기로 구성된 올리고펩타이드 중에서 선택된 어느 하나의 단백질 전달 도메인을
합시켜 융합 단백질을 제조함으로써 세포침투성이 부여되도록 하였다.

따라서, 본 발명은 EC SOD의 아미노 말단에 HIV-1 Tat의 형질도입부위(아미노산 잔
49~57), 5~12개의 아르기닌 잔기로 구성된 올리고펩타이드 및 5~12개의 라이신

잔기로 구성된 올리고펩타이드 중에서 선택된 어느 하나의 단백질 전달 도메인이 결합된 세포침투성 EC SOD 융합 단백질을 제공한다.

바람직하게는, 본 발명의 세포침투성 EC SOD 융합 단백질은 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 갖는다.

상기에서 EC SOD는 사람 및 마우스를 포함하는 포유동물, 바람직하게는 사람으로부터 유래된 단백질을 말한다. 상기 사람 성숙 EC SOD는 222개의 아미노산으로 구성되어 있으며, C-말단 영역(아미노산 잔기 210번~215번)에 헤파린 결합 도메인(heparin binding domain)을 가지고 있다. 사람 성숙 EC SOD의 아미노산 서열은 서열번호 11에 나타낸 바와 같다. 또한, 상기에서 EC SOD는 헤파린 결합 도메인 이하(아미노산 잔기 210번~222번)가 제거된 것일 수 있다.

상기 단백질 전달 도메인은 자신뿐만 아니라 다른 종류의 올리고뉴클레오타이드, 펩타이드, 단백질 및 올리고당과 같은 고분자 유기화합물을 별도의 수용체나 에너지를 필요로 하지 않고 세포 내로 도입시킬 수 있는 수 개의 아미노산 잔기로 구성되어 있는 올리고펩타이드를 말한다. 본 발명에서 상기 단백질 전달 도메인으로는 HIV-1 Tat 형질도입부위, 5~12개의 아르기닌 잔기로 이루어진 올리고펩타이드 및 5~12개 라이신 잔기로 이루어진 올리고펩타이드를 사용할 수 있다. 바람직하게는, HIV-1 Tat의 아미노산 49~57번에 해당하는 9개의 아미노산 잔기(RKKRRQRRR)로 이루어진 형

도입부위, 9개의 아르기닌 잔기로 이루어진 올리고펩타이드 및 10개의 라이신 잔기

이 이루어진 올리고펩타이드를 사용할 수 있다.

본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 융합 단백질이 사람 케라티노사이트 세포 내 침투하여 핵 내에 위치할 수 있음을 실험을 통해 확인할 수 있었다(실시예 4조).

한, 본 발명은 상기 EC SOD 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 EC SOD의 cDNA의 5' 말단에 HIV-1 Tat의 형도입부위, 5~12개의 아르기닌 잔기로 구성된 올리고펩타이드 및 5~12개의 라이신 잔기로 구성된 올리고펩타이드로 이루어진 단백질 전달 도메인 중에서 선택된 어느 하나를 코딩하는 DNA 서열이 결합되어 있는 것을 특징으로 한다.

한, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 EC SOD가 결합된 단백질 전달 도메인의 말단에 6개의 히스티딘 잔기를 코딩하는 DNA서열이 결합되어 있는 것을 특징으로 한다.

람직하게는, 본 발명의 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18 및 서열번호 19에 나타낸 바와 같다.

한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

람직하게는, 본 발명에 따른 발현 벡터는 EC SOD 또는 헤파린 결합 도메인이 제거

ΔHD/EC SOD, 단백질 전달 영역 및 6개의 히스티딘을 발현시킬 수 있는 cDNA 및 이들의 발현을 조절할 수 있는 발현 조절 서열을 포함하고 있다. 보다 바람직하게는 본 발명에 따른 발현 벡터는 도 11에 기재된 바와 같은 개열 지도를 갖는다. 여기서 "발현 조절 서열 (expression control sequence)"이란 특정한 숙주 세포에 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 상기 발현 조절 서열로는 전사를 실시하기 위한 프로모터, 상기 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열 프로모터, 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서가 이에 포함될 수 있다.

따라서, 본 발명은 상기 발현 벡터로 형질전환된 미생물을 제공한다. 상기 미생물은 본 발명의 세포침투성 EC SOD 융합 단백질을 발현시킬 수 있는 것이라면 특별한 제한 없이 사용할 수 있다. 예를 들어, 대장균, 바실러스, 슈도모나스, 스트렙토마세스와 같은 세균, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵 숙주 세포, 스포도프테르루기페르다 (SF9)와 같은 곤충 세포, CHO 및 마우스 세포와 같은 동물 세포 및 직접 배양된 인간 세포 및 식물 세포들이 포함된다. 바람직한 미생물로는 대장균 및 실러스 서브틸리스와 같은 세균 등이 포함된다. 사용목적에 따라서는 인체에서 안정성이 입증된 식품용 미생물 예를 들어 유산균 등을 사용할 수 있다.

한, 본 발명은 (a) 상기의 재조합 발현 벡터로 숙주 미생물을 형질전환시키는 단

기;

b) 상기 (a) 단계에서 제조된 형질전환체를 상기 폴리뉴클레오타이드 서열이 발현되기 적합한 배지 및 조건 하에서 배양하는 단계; 및

c) 상기 (b) 단계의 배양물로부터 상기 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 실질적으로 순수한 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포침강 EC SOD 융합 단백질의 제조방법을 제공한다.

본 발명에서 "실질적으로 순수한"이란 본 발명에 따른 융합 단백질이 박테리아로부터 유래된 다른 단백질을 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다.

본 발명은 본 발명의 세포침투성 EC SOD 융합 단백질을 유효성분으로 하는 활성 산종 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

한, 본 발명은 EC SOD 단백질을 유효성분으로 하는 활성 산소종 관련 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 EC SOD 단백질은 공지된 EC SOD 산서열을 이용하여 유전공학적 방법에 의하여 제조할 수 있다.

본 발명에서 "활성 산소종 관련 질환"이란 활성 산소종에 의해 유발되는 질환을 의미한다. 본 발명에서는 특히, 피부에서 활성 산소종에 의해 유발되는 질환을 하며, 예컨대 피부암 또는 기미, 주근깨 등과 같은 색소성 질환 등이 있으며 피부 화 및 유해자외선 또는 방사선에 의해 유발되는 광노화, 피부염의 예방 및 치료에 용할 수 있다.

상기 세포침투성 EC SOD 용합 단백질 또는 EC SOD 단백질은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응은 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체로서, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 글로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다
emington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

발명에 따른 세포침투성 EC SOD 용합 단백질 또는 EC SOD 단백질은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있다. 비경구 투여용 제형으로는 등장성 수용액 또는 탁액 형태와 같은 주사용 제형 및 연고제 형태의 제형이 바람직하다. 주사용 제형에 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로

형화될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는 이에 한정되지는 않으나, 분말, 캡슐, 정제, 환약 및 캡슐 등이 있으며, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제 (예 : 토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제 (예 : 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌리콜)를 포함할 수 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸 셀룰로즈 및/또는 폴리비피롤리딘과 같은 결합제를 포함할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 미제, 및 감미제를 포함할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니며, 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다.

따라서, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 피하, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입과 같은 방법으로 비경구로 투여할 수 있다. 예를 들면, 주사용으로 제형화된 본 발명에 따른 약학적 조성물을 4~6mm의 가는 바늘로 피부 아래층에 일정량을 주입하거나 또는 30 게이지 (age) 주사바늘로 피부를 가볍게 단자 (prick)하는 방법인 메소 테라피 (Meso therapy)법에 의해 투여할 수 있다. 또한, 피부에 적용할 경우 연고제와 같은 형태 제형화하여 경피 투여할 수 있다. 상기에서 "경피 투여"는 약학적 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학적 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로

달되는 것을 의미한다. 특히, 본 발명의 세포침투성 EC SOD 용합 단백질을 유효성
으로 하는 약학적 조성물의 경우에는 피부에 직접 도포하는 경피 투여방법에 의해
여하는 것이 바람직하다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 단백질 전달방법과
관련된 생명공학적인 기법을 이용하여 투여될 수 있다.

상기 본 발명에 따른 약학적 조성물은 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양으로
자에게 투여될 수 있다. 일반적인 1일 투여량으로는 약 0.0001 내지 100mg/kg의
위로 투여될 수 있다. 바람직하게는, 약 0.01 내지 1mg/kg의 범위로 투여될 수 있
다. 본 발명의 약학적 조성물은 바람직한 투여량 범위 내에서 1회 또는 수회로 분할
투여할 수 있다. 그러나, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 투
대상, 연령, 성별, 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택할 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명의 세포 침투성 EC SOD 용합 단백질을 코딩하는 폴리뉴
클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 유효성분으로 하는 활성 산소종 관련 질환의 예
또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 활성 산소종 질환은 상기에서 정의한 바
와 같다.

또한, 본 발명은 EC SOD 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현
터를 유효성분으로 하는 활성 산소종 관련 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학적
성분을 제공한다. 활성 산소종 관련 피부 질환은 상기에서 정의한 바와 같다.

3기에서 발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터일 수 있으며, 상기 발현 벡터-당업계에 공지된 다양한 방법으로 감염 (infection) 또는 형질도입 (transduction) 의해 발현형으로 표적 세포 내에 도입시킬 수 있는 것을 말한다.

플라스미드 발현 벡터는 사람에게 사용할 수 있는 FDA의 승인된 유전자 전달방법으로 사람 세포에 직접적으로 플라스미드 DNA를 전달하는 방법이다 (Nabel, E. G., et al., *Science*, 249:1285-1288, 1990). 본 발명에서 사용할 수 있는 플라스미드 발현 벡터로는 당업계에 공지된 포유동물 발현 플라스미드를 사용할 수 있다. 예를 들면 이에 한정되지는 않으나 pRK5 (유럽특허 제307,247호), pSV16B (국제특허공개 제 WO/08291호) 및 pVL1392 (PharMingen) 등이 대표적이다.

상기 플라스미드 발현 벡터는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염 (transient transfection), 미세주사, 형질도입 (transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염 (liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염 (DEAE dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염 (polybrene-mediated transfection), 전기침공법 (electroporation), 유전자 건 (gene gun) 및 세포 내로 A를 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 표적 세포 내로 도입할 수 있다 (Wu et al., *J. Bio. Chem.*, 267:963-967, 1992; Wu and Wu, *J. Bio. Chem.*, 263:14621-14624, 1988).

본 발명에 따른 핵산을 포함하는 바이러스 발현 벡터로는 이에 한정되지는 않으나, 레트로바이러스 (retrovirus), 아데노바이러스 (adenovirus), 헤피스바이러스 (herpes virus) 및 아비폭스바이러스 (avipox virus) 등이 포함된다.

상기 바이러스 벡터는 공지의 방법에 의해 투여될 수 있다. 예를 들면, 국소적으로 비경구, 경구, 비강, 정맥, 근육 내, 피하 내 또는 다른 적절한 수단에 의해 투여될 수 있다. 특히, 상기 벡터는 표적 세포에 유효량으로 직접 주사할 수 있다.

한, 본 발명은 본 발명의 세포침투성 EC SOD 용합 단백질을 포함하는 화장품 조성물을 제공한다. 상기 화장품 조성물은 활성 산소종에 의해 유발되는 노화 또는 미, 주근깨와 같은 색소 침착성 피부 질환에 매우 효과적으로 사용될 수 있다. 상에서 노화란 자연노화 및 광노화를 모두 포함한다. 자연노화란 나이가 들어감에 따라 자연적으로 발생하는 노화를 말하며, 광노화란 자외선 등에 인위적으로 노출되면서 발생하는 노화를 말한다. 또한, 본 발명의 화장품 조성물은 상기와 같은 노화에 의해 유발되는 주름의 예방 및 개선에 효과적이다.

본 발명의 용합 단백질을 포함하는 기능성 화장품 조성물은 통상의 방법에 따라 제할 수 있다. 본 발명에 따른 용합 단백질은 화장품 조성물의 건조중량에 대하여 0.01~50중량%, 바람직하게는 0.1~20중량%의 함량으로 함유될 수 있다.

본 발명에 사용하기 위한 본 발명의 용합 단백질을 함유하는 화장품 조성물은 피부에 용 가능한 부형제와 함께 기초 화장품 조성물 (화장수, 크림, 에센스, 클렌징 폼, 렌징 워터, 팩, 보디 오일), 색조 화장품 조성물 (화운데이션, 립스틱, 마스크라, 이크업 베이스) 등에 적용 될 수 있다. 부형제는 화장품 조성물에 적용 가능한 피연화제, 피부 침투 증강제, 착색제, 방향제, 유화제, 능후제 및 용매를 포함할 수 있다

· 나아가, 본 발명은 본 발명의 세포 침투성 EC SOD 용합 단백질을 포함하는 식품 조물을 제공한다. 또한, 본 발명은 EC SOD 단백질을 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품 조성물은 활성 산소종 관련 질환 특히, 활성 산소종 관련 피부 질환의 개선 또는 예방을 위해 사용될 수 있다.

3기 본 발명의 식품 조성물은 본 발명의 세포 침투성 EC SOD 용합 단백질 또는 EC D 단백질을 식품학적으로 허용되는 담체와 함께 건강식품 조성물의 형태로 제조할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 세포 침투성 EC SOD 용합 단백질 또는 EC SOD 단백질을 당업계에 통상적인 방법에 따라 희석제, 부형제 등과 함께 혼합하여 경제, 셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 가공될 수 있다.

E한, 본 발명은 본 발명의 세포침투성 EC SOD 용합 단백질을 또는 EC SOD를 코팅하는 리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 미생물을 유효성분으로 하는 식품 조성물을 제공한다. 상기에서 미생물은 인체에서 안전성이 입증된 식품용 미생 예를 들어 유산균 등을 사용할 수 있다.

3기 미생물은 다양한 제형과 방법으로 제조 및 투여될 수 있다. 예를 들어, 유효의 상기 미생물을 약제학적 분야에서 통상적으로 사용하는 담체와 혼합하여 제조할 수 있다. 담체로는 예를 들어, 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료를 혼합하여 경제, 트포키, 캡슐, 엘릭시르, 서멘션, 시럽, 웨이퍼 (wafer), 산제, 과립제 등의 형태로 사용할 수 있다. 바람직한

투여방식으로는 경구 투여한다. 이외에 본 발명 약학 조성물은 당업계에 공지된 마
-크로 캡슐화과 같은 각종 제형의 형태로 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다.
여 용량은 체내에서 활성 성분의 흡수도, 분할성을 및 배설속도, 환자의 연령, 성
상태 및 치료할 질병의 중증도에 따라 적절히 선택할 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예
한정되는 것은 아니다.

실시예 1>

1>마우스 피부에서의 EC SOD의 분포 양상 조사

-1) 면역조직염색법을 이용한 마우스 피부에서의 EC SOD의 분포 확인

1>부 조직 내 EC SOD 분포를 확인하기 위하여 면역 조직 염색을 수행하였다.

LB/C 마우스(대전 생명공학 연구소, 8~10주령, 자성)의 등 피부조직을 취하여 포
알데히드로 고정시킨 다음 공지의 방법을 이용하여 파라핀 블록을 제작하였다. 상
파라핀 블록에 크실렌(xylen)을 처리하여 파라핀을 제거하고 이어서 단계적으로
코올을 처리하여 탈수시킨 후 면역반응을 강화시키기 위해 구연산 완충액(citric
id buffer)을 이용하여 121℃에서 10분간 열처리하였다. 그 다음으로 상기 조직

료에 3% 과산화수소 (H_2O_2)를 처리하여 과산화효소를 억제하고, 1차 항체인 토끼 항-마우스 EC SOD 항체를 1:500의 농도로 첨가하여 60분간 반응시켰다. 상기 토끼 항-마우스 EC SOD 항체는 마우스 EC SOD를 토끼에 면역원으로 주사하여 면역화시킴으로 수득하였다. 상기 항체로 반응시킨 반응물을 0.1M PBS로 세척하고 바이오틴이 결합되어 있는 염소 항 토끼 IgG가 포함된 링크 항체 (Universal LSAB 2 kit, Dako, ostrup, Denmark) 200 μ l첨가하여 15 분간 반응시켰다. 이때 음성대조군으로는 면역화하지 않은 (pre-immune) 토끼 혈청을 사용하였다. 반응이 완료된 조직 시료를 S로 세척한 다음 퍼옥시다아제가 결합된 스트렙타비딘 (peroxidase-conjugated streptavidin)과 반응시킨 후 기질액인 3-아미노-9-에틸-카르바졸 (AEC, chromogen, ah, USA)로 발색시켰다. 발색된 조직 시료는 통상적인 방법에 따라 표본으로 제작하고 현미경하에서 400배의 배율로 관찰하였다.

실험 결과, 마우스의 피부 조직 전반에 걸쳐 EC SOD가 분포되어 있음을 확인할 수 있었다. EC SOD는 진피층의 결합조직(connective tissue)에 널리 퍼져 있는 것이 관찰되었고, 특히 진피층의 모낭(hair follicle) 주변과 혈관 주위에 더욱 강하게 염색되어 있는 것이 관찰되었다. 또한 표피층의 세포 내에도 강하게 염색이 되어 피부서 EC SOD가 활성 산소종의 조절과 관련된 활성을 가지고 있을 것으로 추정되었다 (1)

-2) 노년 플랫폼 분석법을 이용한 마우스 피부에서의 EC SOD 발현 양상 조사

상기 실시예 1-1)의 BALB/C 마우스의 귀 피부 조직을 수술가위로 절단하여 취하고, Ca^{2+} , Mg^{2+} -프리 포스페이트 완충 염수 (Ca^{2+} , Mg^{2+} -free phosphate-buffered saline, 7.4)로 세척하였다. 상기 피부조직을 0.5% 트립신 (GIBCO, Invitrogen Corporation, California, U.S.A)/PBS에 진피층이 아래쪽으로 가도록 하여 50분간 $37^{\circ}C$ 에서 반응시킨 다음 진피층으로부터 상피층을 분리하였다.

분리한 상기 상피층과 진피층으로부터 각각 총 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 20g을 1.2% 포름알데히드 젤 전기영동법으로 분리한 다음 겔에 있는 mRNA를 나일론 브레인으로 이동시킨 후 멤브레인에 붙어있는 RNA를 UV로 교차결합 시켰다. 상기 브레인에 ^{32}P 로 표지된 마우스의 EC SOD의 cDNA 프로브를 $65^{\circ}C$ 에서 혼성화하였다. 기 EC SOD의 cDNA는 마우스 피부 EC SOD cDNA를 포함하는 pCRII TOPO 벡터 (한림대학교, 서준교 교수로부터 제공받음) (Suh JG et al., *Mol Cells*. 30:7 (2), 204-7, 97)를 주형으로 하여 하기의 프라이머로 PCR 증폭함으로써 제조하였다. PCR 조건 $94^{\circ}C$ 에서 1회, $94^{\circ}C$ 에서 30초, $55^{\circ}C$ 에서 30초, $72.5^{\circ}C$ 에서 45초를 30회 반복 한 $72.5^{\circ}C$ 에서 5분간 1회 실시하였다.

상 프라이머 (서열번호 1)

5'-ATG TTG GCC TTC TTG TTC-3'

상티센스 프라이머 (서열번호 2)

5'-TTA AGT GGT CTT GCA CTC-3'

상기에서 혼성화가 완료되면 이를 세척한 후 상기 멤브레인을 필름에 노출시킨 다음 상하여 mRNA를 확인하고 분자 이미저 (molecular imager, Image Master-VDS, Amersham Biotech)로 분석하였다. 실험군간의 유의차는 스튜던트 T-테스트 방법으로 결정하였다.

실험 결과, EC SOD의 mRNA는 표피층에 비해 진피층에서의 발현이 7배정도 강한 것으로 나타났다 (도 2). 상기 실험 결과로부터 EC SOD는 진피층을 이루고 있는 섬유아세포 및 내피세포 (endothelial cell)에서 강하게 발현되는 것으로 추정할 수 있었다. 이러한 결과로부터 EC SOD가 피부 전체에서 피부를 보호하며 특히, 진피 내의 결합조직을 활성산소종으로부터 보호하는 활성이 높을 것으로 추정되었다.

-3) UVA를 조사한 후 마우스 피부 내 EC SOD의 발현 양상 조사

직접적으로 생체 내 피부에서의 EC SOD의 역할을 조사하고자 마우스의 등 피부 (dorsal skin)에 UVA를 조사한 후 경시적으로 RNA를 분리하고 노던 블롯분석을 실시하여 UVA 조사에 따른 EC SOD 발현 양상을 조사하였다.

ALB/C 마우스 3마리씩을 한 그룹으로 하여 각 그룹의 마우스의 털을 면도하고 24시간 후에 자외선 용량을 달리하여 UVA를 조사하였다. 상기 마우스를 칸막이가 있는 이지에 넣고 9.7mW/cm^2 의 에너지를 방사하는 6개의 UVA 램프 (F24T12/BL/HO,

tional Biological corporation, USA) 로 한 그룹에는 $5\text{kJ}/\text{m}^2$ 을 조사하고, 다른 그룹에는 $25\text{kJ}/\text{m}^2$ 을 조사하였다. 대조군에는 UVA를 조사하지 않았다.

VA 조사 후 시간의 경과에 따라 각 실험군 마우스의 피부조직을 수술용 칼과 가위 분리하고, 이로부터 총 RNA를 추출한 다음 상기 실시예 1-2)와 동일한 방법으로 클랏을 실시하여 EC SOD mRNA의 발현 양상을 조사하였다. 발현된 mRNA의 양은 자 이미지를 사용하여 정량적으로 분석하였다. 로딩 대조군으로는 GAPDH를 이용한다.

실험 결과는 각 실험군 당 평균 \pm 표준편차로 나타냈으며, 각 실험군의 발현 정도는 조군의 발현 양을 100%로 하고, 이에 대한 각 실험군의 발현 양을 상대적으로 나타낸다. 또한, 대조군과 실험군간의 유의차는 스튜던트 T-테스트 방법으로 평가하였다.

실험 결과, EC SOD의 발현은 $5\text{kJ}/\text{m}^2$ 의 조사에 의해 영향을 받지 않았으며, $25\text{kJ}/\text{m}^2$ 로 조사한 경우에는 초기에 그 발현이 감소되었다가 자외선을 조사한 지 6시간 후 $338\pm 2\%$ ($p<0.05$)로 최대점을 이룬 다음 자외선 조사 후 96시간 이후에는 감소하 경향을 나타냈다(도 3). 따라서, EC SOD의 발현은 UVA의 강도 및 시간에 따라 조됨을 알 수 있었으며, 이로부터 EC SOD가 UVA 조사 후 과생성되는 활성 산소종과 1에 따른 변화로부터 조직을 보호하는 기능을 수행할 것으로 추정되었다.

-4) UVB를 조사한 후 마우스 피부 내 EC SOD의 발현 양상 조사

마우스의 등 피부에 UVB를 조사한 후 경시적으로 RNA를 분리하고 노던 블랏분석을
시하여 UVB 조사에 따른 EC SOD의 발현 양상을 조사하였다. 상기 실시예 1-3)과
일한 방법으로 BALB/C 마우스 3마리씩을 한 그룹으로 나눈 다음 0.6mW/cm²의 에너
를 방사하는 6개의 UVB 램프 (FS24T12/UVB/H0, National Biological corporation,
A)로 각 그룹에 2kJ/m², 8kJ/m² 및 15kJ/m² 씩을 조사하였다. 자외선 조사 후 상기
실시예 1-2)와 동일한 방법으로 mRNA의 발현 양상을 조사하였다.

실험 결과, EC SOD mRNA의 발현은 UVB 2kJ/m²를 조사한 후 초기에 73.8%(p<0.05)로
소하였으나 24 시간 후에는 대조군의 수준으로 다시 회복되었다. 8kJ/m²의 강도로
조사한 경우 48시간 후에 EC SOD의 발현량이 212±1%(p<0.05)로 증가하였으며,
kJ/m²의 강도로 조사한 경우에는 48시간 후에 EC SOD의 발현량이 322±5%(p<0.05)
증가하여 최대치를 나타냈다(도 4). 따라서, EC SOD의 발현은 UVB의 강도 및 시
의 경과에 따라 영향 받음을 알 수 있었다.

-5) PUVA를 처치한 후 마우스 피부 내 EC SOD의 발현 양상 조사

마우스에 임상치료에 널리 쓰이는 PUVA를 처치한 후 경시적으로 RNA를 분리하고 노
블랏분석을 실시하여 PUVA 처치에 따른 EC SOD의 발현 양상을 조사하였다.

상기 실시예 1-3) 과 동일한 방법으로 BALB/C 마우스 3마리씩을 한 그룹으로 나눈다. 마우스의 등에 8-MOP (0.2 (w/v) % 8-methoxy psoralen, ICN Pharmaceuticals, Costa sa, USA) 100 μ l를 바르고 1시간 뒤에 상기 실시예 1-3) 과 동일한 UVA 램프를 사용하여 각각 5kJ/m²과 25kJ/m²의 세기로 조사하였다. 이때, 대조군에는 0.2 (w/v) % MOP만 처리하였다. 자외선 조사 후 상기 실시예 1-2)와 동일한 방법으로 EC SOD NA의 발현 양상을 조사하였다.

실험 결과, EC SOD mRNA의 발현량은 8-MOP만을 처리한 대조군 및 8-MOP 처리 후 J/m² UVA를 조사한 경우는 변화가 없었다. 25kJ/m² UVA를 조사한 경우의 EC SOD NA의 발현량은 자외선을 조사한 후 서서히 증가하여 48시간 후에 264 \pm 5% (p<0.05) 나타나 현저히 증가하는 양상을 보였다.

상기 실험 결과로부터 EC SOD의 발현 양상은 자외선의 강도 및 시간의 경과에 따라 함을 받는다는 사실을 알 수 있었다. 따라서, EC SOD는 자외선 조사 후 생성되었나 자외선으로 인한 염증반응에서 생성된 독성을 지닌 활성 산소종으로부터 피부를 보호하는 활성과 관련이 있을 것으로 추정되었다.

실시예 2>

자외선 조사에 따른 마우스 EC SOD 과발현 세포주 내 활성 산소의 변화

3지된 유전자 발현 시스템인 Tet off-MEF/3T3 유도성 유전자 발현 시스템 (Clontech)를 이용하여 마우스 배아 섬유아세포 (mouse embryonic fibroblast)에 EC D를 과발현시킨 다음 상기 세포에 자외선을 조사하고 세포 내 활성산소를 측정하였

-1) 마우스 EC SOD 과발현 세포주의 구축

I를 위해 먼저, TET OFF 시스템의 조절 벡터인 TRE2 벡터 (Clontech)의 Sal I 자리 마우스의 EC SOD cDNA를 삽입하였다. 상기 마우스 EC SOD의 cDNA는 마우스 EC D의 cDNA를 포함하는 pCRII TOPO 벡터 (한림대학교 의과대학, 서준교 교수로부터 제 받음)를 하기 프라이머로 PCR 증폭함으로써 제조하였다. PCR 조건은 94℃에서 1. 94℃에서 30초간, 55℃에서 30초간, 72.5℃에서 45초간 30회 반복 한 후 72.5℃ 서, 5분간 1회 실시하였다.

II스 프라이머 (서열번호 3)

’-AGT CTC GAG ATG TTG GCC TTC TTG TTC TAC GGC-3’

III타겟스 프라이머 (서열번호 4)

’-GATC CTC GAG TGG TCT TGC ACT CGC TCT-3’

상기에서 제조한 벡터와 하이스로마이신 저항서열을 지닌 pTG76 플라스미드를 University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland) 함께 MEF3T3/TET OFF 포주인 마우스 배아 섬유아세포 (mouse embryonic fibroblast, Clontech)에 리포펙 (lipofectin, Invitrogen)을 사용하여 형질전환시킨 다음 100 µg/mL의 하이그로마신이 포함된 배지에서 배양하여 저항성이 있는 클로니만을 선택하였다. 상기 클로지에서 테트라사이클린을 제거하였을 때 EC SOD가 과발현되는 세포주를 구축하였다. 즉, 상기 클로니를 10% TET 프리 FBS (Clontech), L-글루타민, 5000UI/L 페니실 스트렙토마이신, 100 µg/mL의 G418, 100 µg/mL 하이그로마이신 및 2ng/mL 테트라사이클린을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하다가 EC SOD를 과발현시키기 위해 테트라사이클린을 제거하였다. 테트라사이클린의 제거는 상기 세포를 테트라사이클린을 제거한 새로운 배지에 옮겨서 배양함으로써 수행하였다. 상기 세포를 새로운 배지에 겨 48시간 동안 배양함으로써 EC SOD의 과발현을 유도하고, EC SOD의 발현 정도 및 성을 측정하였다. EC SOD의 발현 정도는 상기 실시예 1-2)와 동일한 노던 블롯 방법으로 측정하였으며, EC SOD의 활성은 50mM 탄산나트륨 완충액 (Sodium carbonate buffer, 0.1mM 시트르산 C, 0.5mM 잔틴 함유, pH 10.0) 3mL에 측정하고자 하는 배지료 20µL와 잔틴 산화효소 (Xanthine oxidase, SIGMA) 10µL를 첨가하여 혼합한 후 0 nm에서 흡광도를 측정함으로써 분석하였다.

실험 결과, 테트라사이클린이 제거되는 경우 EC SOD의 mRNA의 발현 및 활성이 경시으로 증가되는 경향을 나타냈다 (도 6). 따라서, 마우스 EC SOD를 과발현하는 세포를 구축할 수 있었다.

~2) 자외선을 조사한 후 마우스 EC SOD 과발현 세포주 내 활성 산소의 측정

상기 2-1)에서 구축한 마우스 EC SOD 과발현 세포주에 자외선을 조사한 후 활성 산소의 양을 측정하였다. 상기 마우스 EC SOD 과발현 세포주는 자외선을 조사하기 전 배지를 제거하고 PBS (pH 7.4)로 2회 세척한 다음 PBS 존재하에서 자외선을 조사한다. 자외선 조사는 상기 세포주에 $27\text{mW}/\text{cm}^2$ 을 방사하는 UVA 램프를 이용하여 J/cm^2 의 UVA를 조사하였으며, $1.15\text{mW}/\text{cm}^2$ 을 방사하는 3개의 UVB 램프를 이용하여 mJ/cm^2 의 UVB를 조사하였다. PUVA 처리는 상기 세포주에 0.1% 8-MOP를 처리하고 분 경과 후 PBS로 2회 세척한 다음 $2\text{J}/\text{cm}^2$ UVA를 조사하였다.

상기와 같은 방법으로 자외선을 조사한 후 경시적으로 세포를 샘플링한 후 $10\text{ }\mu\text{M}$ (Dihydroethidium)을 첨가하여 37°C 에서 20분간 반응시켰다. 이를 1% (w/v) BSA와 0.1% (w/v) NaN_3 가 포함된 PBS로 세척한 다음 유세포분석기 (Flow cytometer)로 분석하였다. 유세포분석기로 측정된 값은 대조군의 활성 산소 양을 1로 하였을 때의 상적인 값으로 나타내었다. 대조군으로는 자외선을 조사하지 않은 세포주를 사용한다.

실험 결과, 마우스 EC SOD 과발현 세포주에 $10\text{J}/\text{cm}^2$ 의 UVA를 조사한 경우 자외선 조사 후 6시간 동안 지속적으로 활성산소의 양이 감소됨을 알 수 있었다 (도 7a). EC SOD가 과발현된 세포주에 $20\text{mJ}/\text{cm}^2$ 의 UVB를 조사한 경우에는 자외선 조사 후 1시간째

활성산소의 농도가 EC SOD가 과발현되지 않은 세포주에 비해 약 60% 정도 감소한

으로 나타났다(도 7b). EC SOD가 과발현된 세포주에 PUVA를 처리한 경우에도 세포의 활성 산소의 양이 EC SOD가 과발현되지 않은 세포주에 비해 매우 크게 감소됨을 인할 수 있었다(도 7c).

이 실험결과로부터 EC SOD가 혈장 및 세포 외 기질에서만 기능하는 것이 아니라 포 내에서도 활성산소의 농도를 효과적으로 감소하는 작용을 가지고 있음을 확인할 있었다.

실시에 3>

자외선 조사에 따른 사람 EC SOD 과발현 세포주의 세포사멸에 관한 영향

-1) 사람 EC SOD 과발현 세포주의 구축

사람 EC SOD 과발현 세포주에서 자외선 조사에 따른 활성 산소의 변화를 조사하기 해 사람 EC SOD 과발현 세포주를 구축하였다. 이를 위해 먼저, pc DNA 3.1/c-His (A) (Invitrogen)의 XbaI, EcoRI 자리에 사람 EC SOD cDNA를 삽입하였다. 사람 EC SOD cDNA는 사람 EC SOD cDNA를 포함하는 pUC 18-hEC SOD 벡터(스웨덴, sinical chemistry, Marklund professor로부터 제공받음)를 주형으로 (Karin almarsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol.84, 6340~4, 1987) 하기 프라이머를

용하여 PCR 증폭하였다. PCR 증폭은 98℃에서 4분간 1회, 98℃에서 30초, 55℃에
- 30초, 72℃에서 45초 30회 및 72℃에서 5분간 1회 조건으로 수행하였다.

5' 프라이머 (서열번호 5)

'-ATC TCT AGA ATG CTG GCG CTA CTG TGT-3'

3' 프라이머 (서열번호 6)

'-ATC GAA TCC TCA GGC GGC CTT GCA CTC GCT CTC -3'

3'에서 수득된 PCR 산물을 아가로스 젤 전기이동 (agarose gel electrophoresis) 하
분리한 다음 XbaI, EcoRI 효소를 처리하여 pcDNA 3.1/ myc-His (A) 벡터에 삽입하
다 (도 8). 상기 플라스미드를 사람 케라티노사이트 (human keratinocyte) 세포주인
aCaT 세포 (하이델부르크 대학, N.E. Fusenig 교수로부터 제공받음, 독일)에 리포펙
(lipofectin, Invitrogen)을 사용하여 형질전환시킨 다음 500 µg/mL의 네오마이신
(NEO) 포함된 배지에서 배양하여 저항성이 있는 클로니만을 선택하여 EC SOD가 과
현되는 세포주를 구축하였다.

3' 세포에서의 EC SOD 과발현을 확인하기 위해서 웨스턴 블랏을 실시하였다. 상
EC SOD 과발현 세포주를 1% NP-40, 0.1% SDS, 프로테아제

제효소 (protease inhibitor)가 포함된 PBS에 넣어 반응시킨 후 원심분리하여 상등액을 수득함으로써 EC SOD 과발현 세포주의 단백질을 추출하였다. 상기에서 추출한 단백질을 15% SDS-PAGE 전기영동하고 나이트로 셀룰로오스 멤브레인에 옮긴 후 5% 지방 밀크 (non-fat milk) /TBS-0.1% 트윈 20 용액으로 1시간 동안 블럭킹 (blocking) 하였다. 그 후 HIS 항체 (Santa Cruz)를 200:1로 희석하여 1시간 반응시킨 후 TBS-0.1% 트윈 20 용액으로 3회 세척하였다. 그 다음 퍼옥시다아제 (peroxidase)가 결합되어 있는 항 토끼 IgG로 1시간동안 반응시키고 3회 세척한 후 ECL 키트 (Amersham Bioscience)로 EC SOD의 발현을 확인하였다. 이때 음성대조군으로는 형질전환시키지 않은 HaCaT 세포주의 단백질을 이용하였다.

실험 결과, 음성대조군인 HaCaT 세포주에는 히스티딘이 결합된 EC SOD가 검출되지 않았으나, EC SOD의 cDNA를 포함하는 플라스미드로 형질전환한 세포주에서는 히스티딘이 결합된 EC SOD가 검출되어 EC SOD가 과발현되었음을 확인하였다 (도 9).

-2) 자외선을 조사한 후 사람 EC SOD 과발현 세포주의 세포사멸 측정

상기 실시예 3-1)에서 구축한 사람 EC SOD 과발현 세포주에 자외선을 조사한 후 활성산소의 양을 측정하였다. 자외선을 조사하기 전에 상기 사람 EC SOD 과발현 세포는 배지를 제거한 후 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고 PBS 존재 하에서 자외선을 조사하였다. 자외선 조사는 1.15mW/cm²를 방사하는 3개의 UVB 램프를 이용하여 10, 20

30mJ/cm²의 UVB를 조사하였다. 24시간 후 세포를 샘플링하여 PBS (pH 7.4)로 세척 후 80% 에탄올을 첨가하여 고정하였다. 세포를 원심분리하여 침전시키고 S (pH7.4)로 세척한 후 1mL PBS (pH 7.4)로 부유시킨 후 투과성 용액 (memobilization solution, 0.5% 트립톤 X-100, 200 μg/mL RNase A, 10 μg/ml 프로 디움 요오드화물) 4mL을 첨가하여 15분 반응시켰다. 유세포 분석기로 세포주기를 식하여 사멸된 세포 (apoptotetic cell, Sub G1)를 백분율로 나타내었다. 이때 대 군으로는 EC SOD를 포함하는 벡터로 형질전환하지 않은 HaCaT 세포주를 용하였다.

실험 결과, UVB를 10mJ/cm²의 세기로 조사한 경우의 사멸된 세포의 비율은 대조군 포주와 EC SOD 과발현 세포주 간에 큰 차이가 나타나지 않았다. 그러나, UVB를 20 30mJ/cm²이 세기로 조사한 경우에는 EC SOD 과발현 세포주의 경우 대조군에 비해 멸된 세포의 비율이 월등히 낮게 나타남을 알 수 있었다 (도 10).

이 실험 결과로부터 EC SOD의 과발현이 사람 케라티노사이트 세포주에서 자외선에 한 세포 사멸을 감소시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 따라서, EC SOD의 과발현 자외선에 의한 피부 세포의 손상을 보호할 수 있음을 알 수 있었다.

실시에 4

II포 침투성 사람 EC SOD 융합 단백질의 제조

-1) 사람 EC SOD 융합 유전자를 포함하는 발현 벡터의 제조

사람 EC SOD 단백질과 단백질 전달 도메인인 HIV-1 Tat, 9개의 아르기닌 잔기로 이루어진 올리고펩타이드 및 10개의 라이신 잔기로 이루어진 올리고펩타이드를 융합시 용합 단백질을 제조하였다. 또한 상기 EC SOD에서 헤파린 도메인이 제거된 Δ /EC SOD 단백질과 HIV-1 Tat를 융합시킨 융합 단백질을 제조하였다.

이를 위해, 먼저 사람 EC SOD 및 사람 Δ HD/EC SOD의 cDNA를 제조하였다. 사람 EC SOD cDNA를 포함하는 pUC 18-hEC SOD (스웨덴, Clinical chemistry, Marklund ofessor로부터 제공받음) 벡터를 주형으로 하기 프라이머 (서열번호 7 및 서열번호 8)를 이용하여 PCR 증폭함으로써 사람 EC SOD의 cDNA를 제조하였다. PCR 증폭 조건은 98℃에서 4분간 1회, 98℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 45초간 30 회, 72℃에서 5분간 1회 수행하였다.

7) 프라이머 (서열번호 7)

5'-GAT CCT CGA GTG GAC GGG CGA GGA CTC GGC-3'

8) 프라이머 (서열번호 8)

5'-GAT CCT CGA GTC AGG CGG CCT TGC ACT CGC T-3'

헤파린 도메인이 제거된 Δ HD/EC SOD의 경우에는 상기와 동일한 조건으로 PCR 증폭을 수행하되 하기 프라이머 (서열번호 9 및 서열번호 10)를 이용하였다.

케스 프라이머 (서열번호 9)

'-GAT CCT CGA GTG GAC GGG CGA GGA CTC GGC-3'

티센스 프라이머 (서열번호 10)

'-AAT GCT CGA GTC ACT CTG AGT GCT CCC GCG C -3'

기에서 수득한 PCR 산물을 아가로스 젤 전기영동 (agarose gel electrophoresis) 하 분리하고 XhoI 효소로 처리하였다. 효소 처리한 상기 성숙 EC SOD cDNA 및 성숙 HD/EC SOD cDNA를 각각 HIV-1 Tat의 기본 도메인 (아미노산 잔기 49~57번 KRRQRRR)이 포함된 pET15 (b) -TAT 벡터 (한림대, 유전공학과, 최수영 교수로부터 분 받음)의 XhoI 자리에 삽입하여 발현 벡터를 제조하였다. 또한, 효소 처리한 상기 성숙 EC SOD cDNA를 9개의 아르기닌 잔기로 이루어진 올리고펩타이드를 포함하는 T15 (b) -R9벡터 (한림대, 유전공학과, 최수영 교수로부터 제공받음) 및 10개의 라이 잔기로 이루어진 올리고펩타이드를 포함하는 pET15 (b) -K10벡터 (한림대, 유전공학 , 최수영 교수로부터 제공받음)의 XhoI 자리에 각각 삽입하여 각각의 발현 벡터를 조하였다 (도 11).

-2) 대장균의 형질전환 및 EC SOD 융합 단백질의 발현

상기 실시예 4-1)에서 제조한 각각의 발현 벡터를 대장균 BL21 (DE3) (Novagen)에 열 충격 (heat shock) 방법으로 형질전환 시킨 후 앰피실린이 포함된 250mL LB 배지에 접종하여 37℃에서 200rpm으로 교반하면서 A₆₀₀이 0.8이 될 때까지 배양하였다. 상기 양액에 IPTG (1mM)를 첨가하여 3시간 더 배양하여 EC SOD 융합 단백질의 과다발현을 도하였다.

-3) EC SOD 융합 단백질의 정제

상기 실시예 4-2)에서 배양한 세포를 원심분리하여 모은 다음 이를 결합 완충액 (binding buffer: 5mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, 6M UREA, pH 7.9)에 부식킨 후 초음파 처리하여 파쇄하였다. 융합 단백질은 N-말단에 6개의 히스티딘을 함유하고 있기 때문에 고정 금속-킬레이트 친화 크로마토그래피 (immobilized tal-chelate affinity chromatography) 단일 단계로 융합 단백질을 거의 순수하게 (도 90%) 정제할 수 있다. 따라서 상기 세포 파쇄액을 원심분리하여 상청액을 회수고 이를 즉시 2.5ml Ni²⁺-니트릴로트리아세틱 애시드 세파로스 컬럼 (nitrilotriacetic acid sepharose column)에 로딩하고 10배 부피의 결합 완충액과 6부피의 세척 완충액 (washing buffer: 30mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, 7.9)으로 세척 한 후 용출 완충액 (elution buffer: 1M 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM is-HCl, pH7.9)으로 융합 단백질을 용출하였다. 이어 융합 단백질이 포함된 분획모아서 세파덱스 G-25 컬럼 (PD 10 column, Amersham Biotech) 크로마토그래피를 수함으로써 탈염하였다. 정제된 TAT-EC SOD 융합 단백질, TAT-Δ HD/EC SOD 융합 단

질, K10-EC SOD 융합 단백질 및 R9-EC SOD 융합 단백질을 전기영동으로 확인하였다

는 12 및 도 13).

-4) 본 발명에 따른 EC SOD 융합 단백질의 세포 침투성 조사

는 발명에 따른 TAT-EC SOD 융합 단백질, TAT-ΔHD/EC SOD 융합 단백질, K10-EC SOD 융합 단백질 및 R9-EC SOD 융합 단백질의 세포 침투성을 사람 케라티노사이트 (keratinocyte) 세포주를 이용하여 조사하였다. 즉, HaCaT 세포를 슬라이드 챔버에 seeding)하고 24시간 후 본 발명에 따라 제조한 EC SOD 융합 단백질을 각각 0, 2 및 4 μM의 농도로 처리하였다. 3시간 후 상온에서 3.7% 포름알데히드/PBS (pH 4)로 10분간 고정시키고, 0.1% 트립톤 X-100/PBS로 10분간 반응시켜 투과성이 있게 하였다. 이를 2% (v/v) FCS/PBS로 상온에서 1시간 동안 블로킹(blocking)하고 HIS 제/2% FCS/PBS/PBS (Santacruz, USA)를 100:1로 희석하여 1시간 반응시킨 다음 2% S/PBS로 3회 세척하였다. 여기에 FITC-결합된 토끼 Ig G (serotec)를 50 :1로 희 하여 1 시간동안 2차 반응을 하고 1 μg/ml PI를 첨가하여 15분 동안 반응시킨 다음 FBP/PBS로 3회 세척하였다. 이를 용입한 다음 공초점 현미경 (confocal microscopy)으로 관찰하였다. 음성 대조군으로는 단백질 전달 도메인을 결합시키지 은 EC SOD 단백질을 이용하였다.

한, TAT-EC SOD 융합단백질 또는 TAT-ΔHD/EC SOD 융합단백질을 처리한 HaCaT 세포로부터 단백질을 추출한 다음 상기 HIS 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 실시

었다. 분석된 밴드의 강도를 정량화하여 상기 전달 도메인을 결합시키지 않은 EC SOD 단백질에 대한 백분율로 나타냈다. 나아가, 상기 K10-EC SOD 융합 단백질 및 T-EC SOD 융합 단백질의 세포 침투 효율을 상기 웨스턴 블롯 분석법으로 분석한 후 T-EC SOD 융합 단백질의 세포 침투 효율에 대한 백분율로 나타냈다.

실험 결과, 음성 대조군은 세포 내에 침투하지 못한 반면, TAT-EC SOD 융합 단백질 경우에는 효율적으로 세포 내에 침투하여 TAT-EC SOD 융합 단백질이 세포질에 위치해 있었으며 TAT-ΔHD/EC SOD 융합단백질도 세포 내에 침투하여 세포질에 위치해 있음을 확인하였다(도 14).

한, 세포투과율을 계산한 결과, TAT-EC SOD 융합 단백질과 TAT-ΔHD/EC SOD 융합 단백질의 세포 침투 효율은 융합 단백질의 처리 농도가 높을수록 높게 나타났으며, T-ΔHD/EC SOD 융합 단백질에 비해 TAT-EC SOD 융합 단백질의 세포 침투 효율이 더 높은 것으로 나타났다(도 15).

한, 9개의 아르기닌 잔기로 이루어진 올리고펩타이드와 EC SOD가 융합된 R9-hEC SOD 융합 단백질의 경우 가장 침투효율이 높은 것으로 나타났으며, 뒤를 이어 10개의 라이신 잔기로 이루어진 올리고펩타이드와 hEC SOD가 융합된 K10-hEC SOD 융합 단백질 및 TAT-EC SOD 융합 단백질의 순서로 침투효율을 나타내었다(표 1).

표 1]

EC SOD 융합단백질의 세포 침투효율	
EC SOD 융합단백질	침투효율 (%)
TAT-hEC SOD	100
R9-hEC SOD	160
K10-hEC SOD	150

발명의 효과]

본 발명에 따른 EC SDO는 피부 세포 내 활성 산소종을 감소시키는 효과가 우수하며
히, 세포침투성 EC SOD 융합 단백질은 세포침투성이 우수하며, 세포 내 활성 산소
을 감소시키는 효과가 우수하여 활성 산소종과 관련된 질환의 예방 및 치료에 유용
게 사용될 수 있다.

특허청구범위]

청구항 1]

C SOD의 아미노 말단에 HIV-1 Tat의 형질도입부위(아미노산 잔기 49~57), 5~12개 아르기닌 잔기로 구성된 올리고펩타이드 및 5~12개의 라이신 잔기로 구성된 올리고펩타이드 중에서 선택된 어느 하나의 단백질 전달 도메인(Protein transduction main)이 결합된 세포침투성 EC SOD 융합 단백질을.

청구항 2]

제1항에 있어서, 상기 EC SOD 융합 단백질은 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것임을 특징으로 하는 세포침투성 EC SOD 융합 단백질.

청구항 3]

제1항 또는 제2항의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4]

제3항에 있어서, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18 및 서열번호 19로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드.

부구항 5]

제3항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터.

부구항 6]

제5항의 발현 벡터로 형질전환된 미생물.

부구항 7]

a) 제5항의 재조합 발현 벡터로 숙주를 형질전환시키는 단계:

b) 상기 (a) 단계에서 제조된 형질전환체를 상기 폴리뉴클레오타이드 서열이 발현되

에 적합한 배지 및 조건 하에서 배양하는 단계: 및

c) 상기 (b) 단계의 배양물로부터 상기 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 실질

으로 순수한 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포침

성 EC SOD 융합 단백질의 제조방법.

부구항 8]

제1항 또는 제2항의 융합 단백질을 유효성분으로 하는 활성 산소종 관련 질환의 예

또는 치료용 약학적 조성물.

부구항 9]

제5항의 발현 벡터를 유효성분으로 하는 활성 산소종 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

부구항 10]

제6항 또는 제8항에 있어서, 상기 활성 산소종 관련 질환이 피부질환임을 특징으로 하는 약학적 조성물.

부구항 11]

제10항에 있어서, 상기 피부질환이 피부암, 색소 침착성 질환, 광노화 및 피부염 중서 선택되는 것임을 특징으로 하는 약학적 조성물.

부구항 12]

C SOD 단백질을 유효성분으로 하는 활성 산소종 관련 피부질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

부구항 13]

제12항에 있어서, 상기 EC SOD 단백질은 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것임을 특징으로 하는 활성 산소종 관련 피부질환의 예방 또는 치료용 약학적

성물.

꺆구항 14]

C SOD 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 유효성분으로
는 활성 산소종 관련 피부질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

꺆구항 15]

꺆14항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열
꺆는 EC SOD 단백질을 코딩하는 것임을 특징으로 하는 활성 산소종 관련 피부질환
예방 또는 치료용 약학적 조성물.

꺆구항 16]

2항 또는 14항에 있어서, 상기 피부질환이 피부암, 색소 침착성 질환, 광노화 및
부염 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 약학적 조성물.

꺆구항 17]

꺆1항 또는 꺆2항의 융합 단백질을 포함하는 화장료 조성물.

㉔구항 18]

㉔17항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 주름 개선용임을 특징으로 하는 화장료 조성물.

㉔구항 19]

㉔1항 또는 제2항의 용합 단백질을 포함하는 활성 산소종 관련 질환의 개선 또는 예방 식품 조성물.

㉔구항 20]

㉔5항의 발현벡터로 형질전환된 미생물을 포함하는 활성 산소종 관련 질환의 개선 또는 예방용 식품 조성물.

㉔구항 21]

C SOD 단백질을 포함하는 활성 산소종 관련 피부 질환의 개선 또는 예방용 식품 조성물.

㉔구항 22]

㉔21항에 있어서, 상기 EC SOD 단백질은 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 활성 산소종 관련 피부 질환의 개선 또는 예방용 식품 조성물.

물.

부구항 23】

C SOD 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 미
생물을 포함하는 활성 산소종 관련 피부 질환의 개선 또는 예방용 식품 조성물.

부구항 24】

제23항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열
갖는 EC SOD 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는 활성 산소종 관련 피부 질
의 개선 또는 예방용 식품 조성물.

부구항 25】

제20항 또는 제23항에 있어서, 상기 미생물이 유산균임을 특징으로 하는 식품 조성

【도면】

Fig. 1)

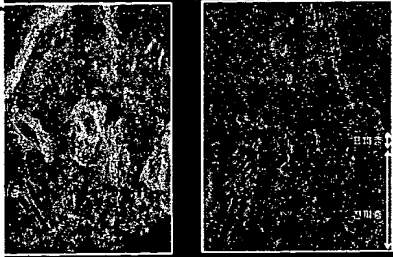
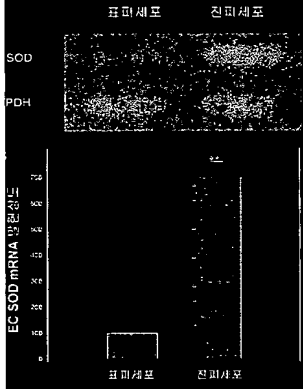


Fig. 2)



E 3]

A

대조군 0 1 3 6 12 24 48 96 (hr)

SOD

APDH

B

대조군 0 1 3 6 12 24 48 96 (hr)

SOD

APDH

E 4]

A

대조군 0 1 3 6 12 24 48 96 (hr)

SOD

APDH

B

대조군 0 1 3 6 12 24 48 96 (hr)

SOD

APDH

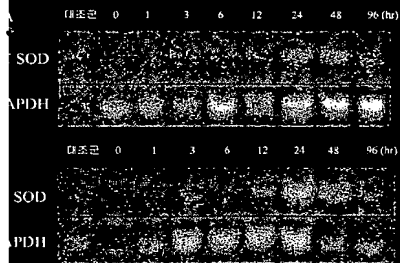
C

대조군 0 1 3 6 12 24 48 96 (hr)

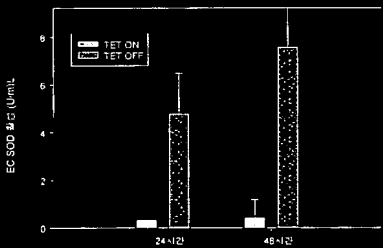
SOD

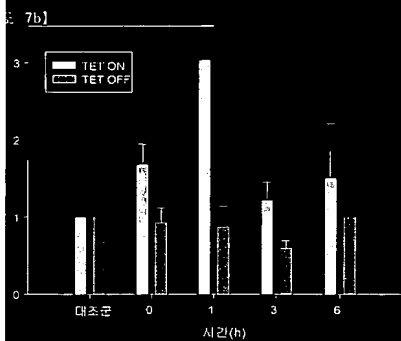
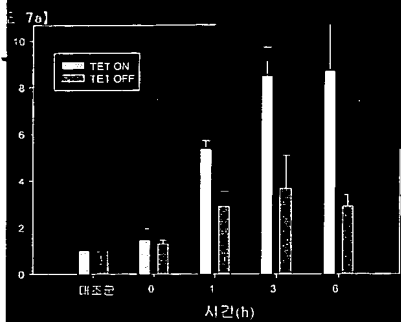
APDH

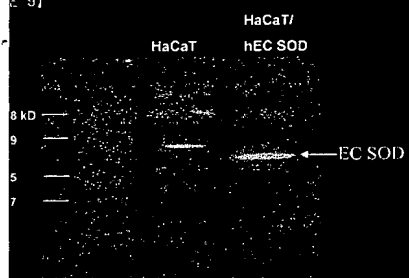
5]



6]



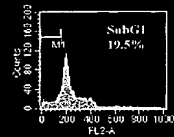
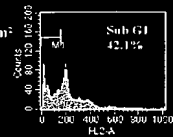
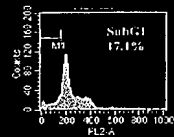
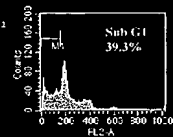
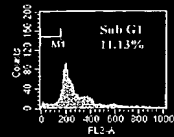
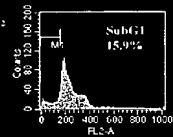
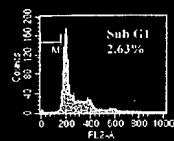
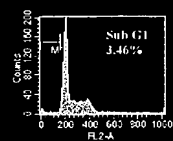




VB 10mJ/cm²VB 20mJ/cm²VB 30mJ/cm²

HaCaT

HaCaT/hEC SOD



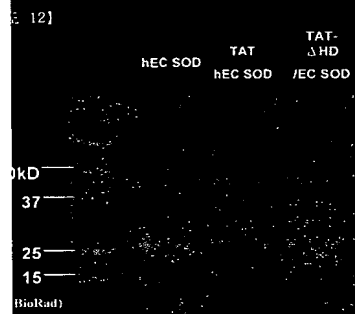
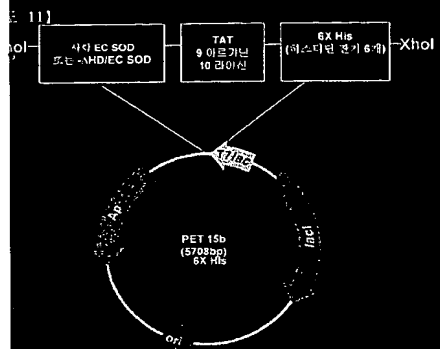


Fig. 13]

EC SOD TAT-EC SOD K10-EC SOD R9-EC SOD

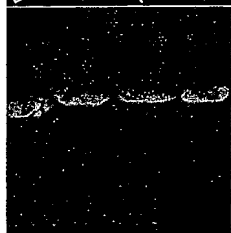


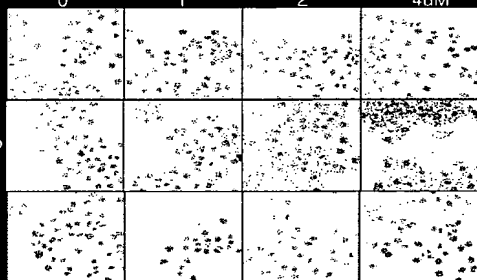
Fig. 14]

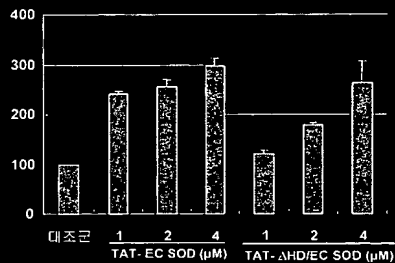
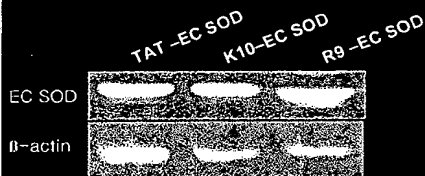
0 1 2 4 μ M

EC SOD

T-EC SOD

TAT-AhD
EC SOD





[시열목록]

1> KIM, TAE-YOON BioCS <120> EC SOD and Cell transducing EC SOD fusion protein
 composition containing the protein as an effective component <160> 19 <170>
 stentim 1.71 <210> 1 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 er <400> 1 atgttggcct tcttgctc 18
 1> 2 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer <400>
 aagttagtc ttgcactc 18 <210> 3 <211>

```

<212>   DNA <213>   Artificial Sequence <220> <223>   Primer <400>   3 agtctcgaga
tgacctt cttgttctac ggc                               33 <210>   4 <211>   28 <212>

<213>   Artificial Sequence <220> <223>   Primer <400>   4 gatcctcgag tggctttgca ctgcctct
<210>   5 <211>   27 <212>   DNA <213>   Artificial Sequence <220> <223>   Primer <400>
5 atctctagaa tgcggcgct actgtgt                               27 <210>   6 <
>   34 <212>   DNA <213>   Artificial Sequence <220> <223>   Primer <400>   6 atcgatcct
tcggcct tgcactgct cttc                               34 <210>   7 <211>   30 <212>

<213>   Artificial Sequence <220> <223>   Primer <400>   7 gatcctcgag tggacggcgc
actcggc                               30 <210>   8 <211>   31 <212>   DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223>   Primer <400>   8 gatcctcgag tcaggcgcc ttgcactgc t
<210>   9 <211>   30 <212>   DNA <213>   Artificial Sequence <220> <223>   Primer <400>
9 gatcctcgag tggacggcgc aggactcggc                               30 <210>   10 <
>   31 <212>   DNA <213>   Artificial Sequence <220> <223>   Primer <400>   10
tcctgag tcactctgag tgcctccgcg c                               31 <210>   11 <211>

<212>   PRT <213>   Homo sapiens <220> <221>   PEPTIDE <222>   (1)..(240) <223>   Human
300 <400>   11 Met Leu Ala Leu Leu Cys Ser Cys Leu Leu Leu Ala Ala Gly Ala Ser   1
                               10                               15 Asp Ala Trp Thr Gly Glu Asp Ser Ala Glu Pro Asn Ser
Ser Ala                               20                               25                               30 Glu Trp Ile Arg Asp Met Tyr
Lys Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu                               35                               40                               45 Val Met
Arg Arg Asp Asp Asp Gly Thr Leu His Ala Ala Cys Gln                               50                               55
Val Gln Pro Ser Ala Thr Leu Asp Ala Ala Gln Pro Arg Val Thr Gly 65                               70
                               80 Val Val Leu Phe Arg Gln Leu Ala Pro Arg Ala Lys Leu Asp Ala Phe
                               90                               95 Phe Ala Leu Glu Gly Phe Pro Thr Glu Pro Asn Ser Ser
Arg Ala                               100                               105                               110 Ile His Val His Gln Phe Gly
Leu Ser Gln Gly Cys Glu Ser Thr                               115                               120                               125 Gly Pro

68-62

```

```

Tyr Asn Pro Leu Ala Val Pro His Pro Gln His Pro Gly      130          135
Asp Phe Gly Asn Phe Ala Val Arg Asp Gly Ser Leu Trp Arg Tyr Arg 145          150
160  Ala Gly Leu Ala Ala Ser Leu Ala Gly Pro His Ser Ile Val Gly Arg
170          175  Ala Val Val Val His Ala Gly Glu Asp Asp Leu Gly Arg
Gly Asn          180          185          190  Gln Ala Ser Val Glu Asn Gly
Ala Gly Arg Arg Leu Ala Cys Cys          195          200          205  Val Val
Val Cys Gly Pro Gly Leu Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu      210          215
His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Cys Lys Ala Ala 225          230
240 <210>  12 <211>  231 <212>  PRT <213>  Artificial Sequence <220>
23>  TAT-EC SOD fusion protein <400>  12 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Trp Thr Gly
Asp Ser Ala   1          5          10          15  Glu Pro Asn Ser Asp
Ala Glu Trp Ile Arg Asp Met Tyr Ala Lys          20          25
Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu Val Met Gln Arg Arg Asp Asp Asp Gly      35
45  Thr Leu His Ala Ala Cys Gln Val Gln Pro Ser Ala Thr Leu Asp Ala      50
60  Ala Gln Pro Arg Val Thr Gly Val Val Leu Phe Arg Gln Leu Ala Pro  65
75          80  Arg Ala Lys Leu Asp Ala Phe Phe Ala Leu Glu Gly Phe
Thr Glu          85          90          95  Pro Asn Ser Ser Ser Arg
Ile His Val His Gln Phe Gly Asp Leu          100          105          110
Gln Gly Cys Glu Ser Thr Gly Pro His Tyr Asn Pro Leu Ala Val      115          120
Pro His Pro Gln His Pro Gly Asp Phe Gly Asn Phe Ala Val Arg Asp      130          135
Gly Ser Leu Trp Arg Tyr Arg Ala Gly Leu Ala Ala Ser Leu Ala Gly 145          150
160  Pro His Ser Ile Val Gly Arg Ala Val Val Val His Ala Gly Glu Asp
170          175  Asp Leu Gly Arg Gly Gly Asn Gln Ala Ser Val Glu Asn
Asn Ala          180          185          190  Gly Arg Arg Leu Ala Cys Cys
Val Gly Val Cys Gly Pro Gly Leu          195          200          205  Trp Glu
68-63

```


Gln Ala Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg 210 215
 Glu Ser Glu Cys Lys Ala Ala 225 230 <210> 13 <211> 218 <212>
 <213> Artificial Sequence <220> <223> TAT-delta HD/EC SOD fusion protein <400> 13
 Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Trp Thr Gly Glu Asp Ser Ala 1 5
 15 Glu Pro Asn Ser Asp Ser Ala Glu Trp Ile Arg Asp Met Tyr Ala Lys
 25 30 Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu Val Met Gln Arg Arg Asp
 Asp Gly 35 40 45 Thr Leu His Ala Ala Cys Gln Val
 Pro Ser Ala Thr Leu Asp Ala 50 55 60 Ala Gln Pro Arg
 Thr Gly Val Val Leu Phe Arg Gln Leu Ala Pro 65 70 75
 Arg Ala Lys Leu Asp Ala Phe Phe Ala Leu Glu Gly Phe Pro Thr Glu 85
 95 Pro Asn Ser Ser Ser Arg Ala Ile His Val His Gln Phe Gly Asp Leu
 105 110 Ser Gln Gly Cys Glu Ser Thr Gly Pro His Tyr Asn Pro
 Ala Val 115 120 125 Pro His Pro Gln His Pro Gly Asp
 Gly Asn Phe Ala Val Arg Asp 130 135 140 Gly Ser Leu Trp
 Tyr Arg Ala Gly Leu Ala Ala Ser Leu Ala Gly 145 150 155
 Pro His Ser Ile Val Gly Arg Ala Val Val Val His Ala Gly Glu Asp 165
 175 Asp Leu Gly Arg Gly Gly Asn Gln Ala Ser Val Glu Asn Gly Asn Ala
 185 190 Gly Arg Arg Leu Ala Cys Cys Val Val Gly Val Cys Gly
 Gly Leu 195 200 205 Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu His
 Glu 210 215 <210> 14 <211> 231 <212> PRT <213>
 ificial Sequence <220> <223> R9-EC SOD fusion protein <400> 14 Arg Arg Arg Arg Arg
 Arg Arg Trp Thr Gly Glu Asp Ser Ala 1 5 10
 Glu Pro Asn Ser Asp Ser Ala Glu Trp Ile Arg Asp Met Tyr Ala Lys 20
 30 Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu Val Met Gln Arg Arg Asp Asp Asp Gly
 40 45 Thr Leu His Ala Ala Cys Gln Val Gln Pro Ser Ala Thr

Asp Ala 50 55 60 Ala Gln Pro Arg Val Thr Gly Val Val
 Phe Arg Gln Leu Ala Pro 65 70 75 80 Arg
 Lys Leu Asp Ala Phe Phe Ala Leu Glu Gly Phe Pro Thr Glu 85
 95 Pro Asn Ser Ser Ser Arg Ala Ile His Val His Gln Phe Gly Asp Leu
 105 110 Ser Gln Gly Cys Glu Ser Thr Gly Pro His Tyr Asn Pro
 Ala Val 115 120 125 Pro His Pro Gln His Pro Gly Asp
 Gly Asn Phe Ala Val Arg Asp 130 135 140 Gly Ser Leu Trp
 Tyr Arg Ala Gly Leu Ala Ala Ser Leu Ala Gly 145 150 155
 Pro His Ser Ile Val Gly Arg Ala Val Val Val His Ala Gly Glu Asp 165
 175 Asp Leu Gly Arg Gly Gly Asn Gln Ala Ser Val Glu Asn Gly Asn Ala
 185 190 Gly Arg Arg Leu Ala Cys Cys Val Val Gly Val Cys Gly
 Gly Leu 195 200 205 Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu His
 Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg 210 215 220 Glu Ser Glu Cys
 Ala Ala 225 230 <210> 15 <211> 232 <212> PRT <213>
 ificial Sequence <220> <223> K10-EC SOD fusion protein <400> 15 Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 Lys Lys Lys Trp Thr Gly Glu Asp Ser 1 5 10
 Ala Glu Pro Asn Ser Asp Ser Ala Glu Trp Ile Arg Asp Met Tyr Ala 20
 30 Lys Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu Val Met Gln Arg Arg Asp Asp Asp
 40 45 Gly Thr Leu His Ala Ala Cys Gln Val Gln Pro Ser Ala
 Leu Asp 50 55 60 Ala Ala Gln Pro Arg Val Thr Gly Val
 Leu Phe Arg Gln Leu Ala 65 70 75 80 Pro
 Ala Lys Leu Asp Ala Phe Phe Ala Leu Glu Gly Phe Pro Thr 85
 95 Glu Pro Asn Ser Ser Ser Arg Ala Ile His Val His Gln Phe Gly Asp
 105 110 Leu Ser Gln Gly Cys Glu Ser Thr Gly Pro His Tyr Asn
 Leu Ala 115 120 125 Val Pro His Pro Gln His Pro Gly
 68-65

Phe Gly Asn Phe Ala Val Arg 130 135 140 Asp Gly Ser Leu
 Arg Tyr Arg Ala Gly Leu Ala Ala Ser Leu Ala 145 150 155
 Gly Pro His Ser Ile Val Gly Arg Ala Val Val Val His Ala Gly Glu 165
 175 Asp Asp Leu Gly Arg Gly Gly Asn Gln Ala Ser Val Glu Asn Gly Asn
 185 190 Ala Gly Arg Arg Leu Ala Cys Cys Val Val Gly Val Cys
 Pro Gly 195 200 205 Leu Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu
 Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg 210 215 220 Arg Glu Ser Glu
 Lys Ala Ala 225 230 <210> 16 <211> 696 <212> DNA <213>
 ificial Sequence <220> <223> nucleotide sequence encoding TAT-EC SOD fusion protein <400>
 aggaagaagc ggaagacagc acgaagatgg acgggcgagg actcgccgga gcccaactct 60 gactcgccgg
 gatccg agacatgtac gccaaagtca cggagatctg gcaggaggtc 120 atgcagcggc gggacgacga
 acgctc cagccggcct gccaggtgca gccgtcgcc 180 acgtggagc ccgcacagcc ccagtgacc
 gtctgc ttttcggca gcttgcgcc 240 cgcgccaagc tcgacgctt cttcgccctg gagggtcttc
 cgagcc gaacagcttc 300 agccgagcca tccacgtgca ccagtcggg gacctgagcc agggctgaga
 accggg 360 cccactaca accgctggc cgtccgac ccgcagcacc cggcgactt cggcaacttc
 cagtcggc acggagcct ctggaagtac cgcgcggcc tggccgctc gctcgccggc 480 cgcactcca
 tggccg ggcctggtc gtccacgtg gcaagagca cctggccgc 540 ggcgcaacc agccagcgt
 aaacgg aacggggc ggcggctggc ctctcgtg 600 atggcggtgt gcggcccg gctctggag
 aggggc ggaagcactc agagcgaag 660 aagcggcggc gcagagcga gtcaaggcc gctga
 <210> 17 <211> 657 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> nucleotide
 ence encoding TAT-delta HD/EC SOD fusion protein <400> 17 aggaagaagc ggaagacagc
 agatgg acgggcgagg actcgccgga gcccaactct 60 gactcgccgg agtggatcc agacatgtac
 aggtca cggagatctg gcaggagtc 120 atgcagcggc gggacgacga cgcacgctc cagccgcct
 aggtga gccatcgcc 180 acgtggagc ccgcacagcc ccagtgacc gacgtcttc ttttcggca
 tgcgcc 240 cgcgccaagc tcgacgctt cttcgccctg gagggtcttc cgaccgagcc gaacagcttc

```

agccgcgcca tccacgtgca ccagttcggg gacctgaagcc agggctgcca gtccaccggg      360 ccccaactaca
>cttggc cgtaccgcac ccgcagcacc cgggcgactt cggcaacttc      420 gcggtccgcg accgcagcct
>aggtac cgcaccggcc tggccgcctc gctgcggggc      480 ccgcactcca tcgtggggcg gcccgtggtc
>accgtg gcgagggcga cctggggcgc      540 ggcggcaacc aggccagcgt ggaagacggg aacgcggggc
>cttggc cgtctgctg      600 gtgggcgtgt gcggggcccg gctctgggag gccagggcg gcgagcactc agagtga
<210> 18 <211> 696 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> nucleotide
ence encoding R9-EC SOD fusion protein <400> 18 cggcggcgcc gcggcgggcg gcggcggtgg
>gcggg actcggcgga gcccaactct      60 gactcggcgg agtggatccg agacatgtac gccaaagtca
>gactcg gcagggaggtc      120 atgcagcgcc gggcagacga cggcagctc cagccggcct gccaggtgca
>tcggcc      180 acgtggagc ccgcgagcc cgggtggcc ggcgtgtcc tcttcggca gtttgcgcc
cgcggcaagc tcgagccctt ctgcgcctg gaggggcttc cgaaggagcc gaacagctcc      300 agccgcgcca
>cgtaga ccagttcggg gacctgagcc agggctgcca gtccaccgg      360 ccccaactaca acccgctggc
>ccgcac ccgcagcacc cgggcgactt cggcaacttc      420 gcggtccgcg accgcagcct ctggaggtac
>ccggcc tggccgcctc gctcggggc      480 ccgcactcca tcgtggggcg gcccgtggtc gtccagctg
>ggacga cctggggcgc      540 ggcggcaacc aggccagcgt ggaagacggg aacgcggggc gcgagctggc
>tgctg      600 gtgggcgtgt gcggggcccg gctctgggag gccagggcg gcgagcactc agagcgcaag
aagcggcgcc gcgagagcga gtgcaaggcc gccgga      696 <210> 19 <
> 699 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> nucleotide sequence
>ding R9-EC SOD fusion protein <400> 19 aagaagaaga agaagaagaa gaagaagaag tggacggggc
>actggc gggcccaac      60 tctgactcgg cggagtggtt ccgagacatg tacgccaaag tcacggaggt
>cagagag      120 gtcatgcagc ggggggacga cgaaggcagc ctccagcccg cctggcaggt gcagccgtcg
ggcagctgg acgcgcgca gcccggggtg accggcgctg tctcttcg gcagcttgg      240 ccccgcgcca
tcagagc cttcttcgcc ctggaggggt tccgaccga gccgaacagc      300 tccagccgcg ccattcacgt
>agttc ggggacctga gccagggctg cgagtccacc      360 gggcccaact acaacccgt gcccgtggcg
>cgcagc accggggcga cttcggaac      420 ttgcgggtcc gcgagggcag cctctggaggg taccggcgcc

```

tagccgc ctgcctcgc 480 ggccgcact ccatctagg ccggccgtg gtgtccacg ctgacgagg
 ctgggc 540 cgcgcggca accaggccag cgtggagaac gggaacgca gccggcgct ggcctgctgc
 gtgtgggc tgtcggcc cggctctgg gaggccagg cgcggagca ctacagcgc 660 aagaaagcgc
 scagag cgaatgcaag gccgcctga 699

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002757

International filing date: 29 October 2004 (29.10.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0076629
Filing date: 31 October 2003 (31.10.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 12 November 2004 (12.11.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☒ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.